

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-220070

(43)公開日 平成6年(1994)8月9日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 F 9/10	B	9155-4H		
A 6 1 K 9/127	F	7329-4C		
47/48	Z	7433-4C		
B 0 1 J 13/02				
		6345-4G	B 0 1 J 13/ 02	Z
審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 8 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平5-27651

(22)出願日 平成5年(1993)1月22日

(71)出願人 000005968

三菱化成株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 田川 俊明

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三
菱化成株式会社総合研究所内

(72)発明者 栗根 かおる

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三
菱化成株式会社総合研究所内

(72)発明者 長池 一博

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三
菱化成株式会社総合研究所内

(74)代理人 弁理士 長谷川 暁司

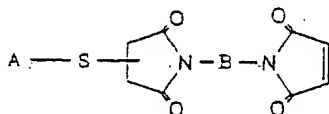
(54)【発明の名称】 リン脂質誘導体及びそれを含有するリポソーム

(57)【要約】

【構成】下記一般式 (I) で表されるリン脂質誘導体及び該リン脂質誘導体を含有するリポソーム。リポソーム*

*としては該リン脂質誘導体を介して抗体をはじめとする蛋白質が結合されているものが好ましい。

【化1】



(I)

(上記式中、Aはフォスファチジルエタノールアミン部分を有するリン脂質の残基を表し、Bはポリアルキレングリコール部分を有する連結基を表す。)

【効果】 本発明のリン脂質誘導体は、リポソームを構成するリン脂質成分として有用であり、これを用いたり

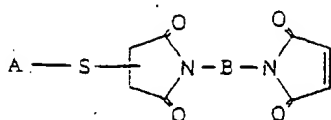
ポソームは、ポリアルキレングリコール部を有することから肝臓、脾臓等の網内系での非特異的取り込みを抑制することができる。また本発明のリン脂質誘導体を用いることにより、容易にリポソームを小粒径化することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式 (I) で表されるリン脂質誘導体 *

* 導体。

【化1】



(I)

(上記式中、Aはフォスファチジルエタノールアミン部分を有するリン脂質の残基を表し、Bはポリアルキレングリコール部分を有する連結基を表す。)

【請求項2】 請求項1記載のリン脂質誘導体を含有するリポソーム。

【請求項3】 リン脂質誘導体を介して蛋白質が結合されていることを特徴とする請求項2記載のリポソーム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規なリン脂質誘導体およびそれを用いたリポソームに関し、詳細にはマレイミド基を有するポリアルキレングリコール部分を有する新規なリン脂質誘導体およびこれを用いたリポソームに関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】脂質膜小球体であるリポソームは、水溶性、疎水性に限らず多くの物質を包含できることから、キャリアーとして、特にドラッグ デリバリー システム (DDS) 用のキャリアーとして高い関心がもたれている。近年リポソーム本来の特性に加え機能性を付与する目的でリポソーム表面へ蛋白質、ペプチド、糖、親水性高分子等の機能性化合物を結合 (導入) する試みが行われてきた。

【0003】一方、リポソームの一般的欠点である凝集、肝臓 脾臓等の網内系臓器での非特異的補足等の改良に向けた研究も多く行われており、ポリエチレングリコールの結合が効果的であることが示されてきた (特開平1-249717号および同2-149512号各公報、FEBS letters, 268, 235 (1990))。

【0004】さらに、近年蛋白質の機能とポリエチレングリコールの特性を合わせ持つことを目的として、両者を併含するリポソームが開示された (BBA, 142, 1062 (1991)、特開平4-346918号公

※報)。前者は、脂質誘導体化した抗体、リン脂質、コレステロール及びポリエチレングリコールの脂質誘導体を界面活性剤で可溶化後、透析で界面活性剤を除去することでリポソームを形成する方法である。しかし、界面活性剤の完全な除去が困難であることから医薬品としての使用に問題がある。また長時間の透析操作を脂質の相転移温度以上の温度で行う必要があるため、特に不安定な蛋白質を用い製造する場合、使用できる脂質の制約等の問題がある。

【0005】後者は、マレイミド基を含有するリポソームを作製後、チオール基を有する蛋白質を結合、さらに過剰のマレイミド基にチオール基を有するポリエチレングリコールを結合する方法である。穏和な条件で蛋白結合ができる反面、二段階の反応であるため製造工程が複雑であること、各成分の結合量を単独でコントロールしにくいとの問題がある。

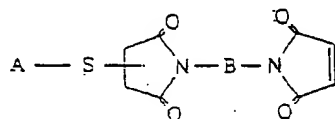
【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる従来の蛋白質およびポリアルキレングリコールを併含するリポソームの問題点を解決すべく検討した結果、ポリアルキレングリコールの一端にマレイミド基を有しかつ他端にフォスファチジルエタノールアミン部分を有するリン脂質誘導体をリポソームを構成する成分として用いることで容易に蛋白質およびポリアルキレングリコールを併含するリポソームを作製し得ることを見いだした。

【0007】さらに驚くべきことにリポソームを小粒径化する過程でこのリン脂質誘導体を含有するリポソームは容易に小粒径化されることを見だし、本発明を完成するに至った。すなわち本発明の要旨は、下記一般式 (I) で表されるリン脂質誘導体およびそれを含有することを特徴とするリポソームに存する。

【0008】

【化2】



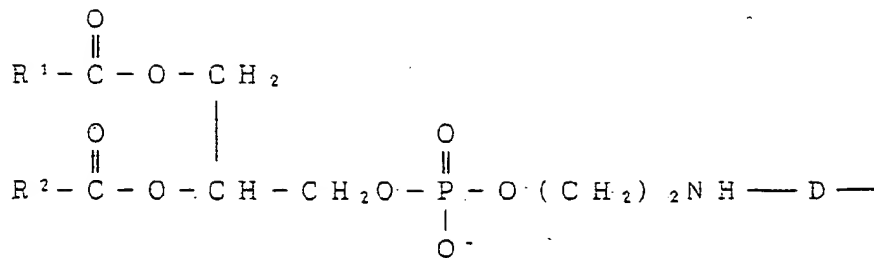
(I)

【0009】(上記式中、Aはフォスファチジルエタノールアミン部分を有するリン脂質の残基を表し、Bはポリアルキレングリコール部分を有する連結基を表す。) 以下、本発明につき詳細に説明する。本発明のリン脂質誘導体は、前記一般式 (I) で表される。Aで定義される「フォスファチジルエタノールアミン部分を有するリ

ン脂質の残基」としては、フォスファチジルエタノールアミノ基を有するものであれば特に制限はされないが、好ましくは下記式にて表される基が挙げられる。

【0010】

【化3】



【0011】（式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立してラウロイル基、ミリストイル基、パルミトイル基、ステアロイル基等の $\text{C}_{11} \sim \text{C}_{19}$ のアルキル基、またはオレイル基等の $\text{C}_{11} \sim \text{C}_{19}$ のアルケニル基を表し、 D は単結合または $-\text{C} = (\text{NH}_2^+) (\text{CH}_2)_{0-10}-$ 、 $-\text{CO} (\text{CH}_2)_{0-10}-$ 、 $-\text{CH}_2 (\text{CH}_2)_{0-10}-$ 等の $\text{C}_1 \sim \text{C}_{11}$ の連結基を表す。）

また B で定義される「ポリアルキレングリコール部分を有する連結基」としては、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリテトラメチレングリコール、ポリヘキサメチレングリコール等のポリアルキレングリコール単位を有するものであれば特に制限はされないが、好ましくは

【0012】

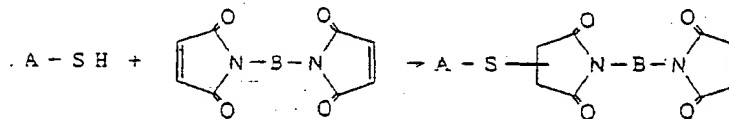
* 【化4】 $-\text{J}-\text{PEG}-\text{L}-$

（式中、 J および L はそれぞれ独立して単結合または $-\text{CO} (\text{CH}_2)_{0-10}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{0-10}\text{CO}-$ 、 $-\text{NHCO} (\text{CH}_2)_{0-10}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{0-10}\text{CONH}-$ 、 $-\text{CH}_2 (\text{CH}_2)_{0-10}-$ 等の $\text{C}_1 \sim \text{C}_{11}$ の連結基を表し、 PEG は $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{11-455}-$ 等で表されるポリエチレングリコール残基を表す。）が挙げられる。

【0013】次に、本発明のリン脂質誘導体の製造法につき説明する。本発明のリン脂質誘導体は、例えばチオール基を有するリン脂質と、2つのマレイミド基を有するポリアルキレングリコールとを反応させることによって製造される。

【0014】

【化5】



【0015】（式中、 A および B は前記定義に同じ）

以下、順次詳細に説明する。

1. チオール基を有するリン脂質（以下、「チオール化リン脂質」と略記することもある）の合成

チオール化リン脂質は、公知のアミノ基修飾反応を用いてフォスファチジルエタノールアミンへのチオール基の導入により達成される。すなわち、イミノチオランやメルカプトアルキルイミデート等の Traunt 試薬とフォスファチジルエタノールアミンとを、トリエチルアミン、ピリジン等の塩基性化合物の存在下、クロロホルム、クロロホルム-メタノール（1/1～10/1）等の有機溶媒に溶解し、20～40℃で窒素ガス、アルゴンガス等の不活性ガスの条件下で反応させて得られる。特開昭64-72067号公報で開示されたチオールカルボン酸を用いて作製することができる。また潜在的に硫黄原子を含有する化合物、例えば N -サクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネートをフォスファチジルエタノールアミンと結合し、大過剰の2-メルカプトエタノール等の還元剤で還元することで合成しても良い。

【0016】ここで用いるフォスファチジルエタノールアミン、すなわち前記一般式（I）の A で定義されるフォスファチジルエタノールアミン部分を有するリン脂質

としては特に限定されるものではなく、卵黄由来等の天然型フォスファチジルエタノールアミン、ジオレイルフォスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン等が用いられ、好ましくはジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンが挙げられる。

2. 2つのマレイミド基を有するポリアルキレングリコールの合成（以下、「ジマレイミドPAG」と略記することがある）

ポリアルキレングリコール部分がポリエチレングリコール（以下、「PEG」と略記することがある）の場合を例にとり、具体的に説明する。

【0017】2つのマレイミド基を有するポリエチレングリコール誘導体は、例えばジアミノポリエチレングリコール（日本油脂またはシグマから入手できる）と少なくとも2倍モルの N -(ϵ -マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド等のマレイミド化試薬とをトリエチルアミン、ピリジン等の塩基性化合物の存在下、モレキュラーシーブ等で脱水したクロロホルム等の有機溶媒に溶解し、20～40℃で窒素ガス、アルゴンガス等の不活性ガス雰囲気下で反応させて得られる。

【0018】マレイミド化試薬としては、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミドの他、アミノ基のマレイミド誘導体を作製するために一般に使用されているN-サクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、N-サクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)プロピオネート、N-(γ-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド等が挙げられる。

【0019】PEG部分の平均分子量は通常500~20000であるが、より好ましくは2000~10000、さらに好ましくは2000~5000である。かかるPEGとしては、サンブライトVFM5001(日本油脂)、ポリオキシエチレンビスアミン(シグマ)等が具体的に挙げられる。

3. 本発明化合物(以下、「M-PAG-PE」と略記することがある)の製造

M-PAG-PEはクロロホルム、クロロホルム-メタノール(1/1~10/1)等の有機溶媒に溶解したジマレイミドPAGに、トリエチルアミン、ピリジン等の塩基性化合物の存在下、同溶媒に溶解したチオール化リン脂質を0~40℃で窒素ガス、アルゴンガス等の不活性ガス雰囲気下に添加、反応させて得られる。このときチオール化リン脂質は徐々に添加し、その添加総量はマレイミド化PAGの等モル量以下、好ましくは1/2モル以下であることが望ましい。

【0020】次に、M-PAG-PEの反応液にヘキサンまたは石油エーテルを加え、PAG含有化合物を析出させる。ろ過した沈澱を乾燥後、M-PAG-PE自体が水溶液中でパーティクル(ミセル)を形成する濃度以上で蒸留水に溶解する。不溶物を分別し、同濃度以上の濃度に保ちながら限外ろ過膜分離法、透析法、ゲルろ過法等で分子量分画することにより、M-PAG-PEを得ることができる。この時、未反応(過剰)のジマレイミドPAG等の不純物は除かれる。なお、必要に応じてシリカゲルカラムにより精製を加えてもよい。

【0021】かくして得られた本発明のリン脂質誘導体は、さらに公知の方法を用いリポソーム化することができる。リポソームはフォスファチジルコリン、コレステロール等の公知の脂質成分とM-PAG-PEで形成してもよいし、公知の脂質成分、M-PAG-PE、特開平1-249717号公報、同2-149512号公報、FEBS letters, 268, 235(1990)等で開示されている他のポリエチレングリコール部分を有する脂質誘導体と混合して用いてもよい。

【0022】脂質成分となるフォスファチジルコリンは特に限定される物ではなく、卵黄等由来の天然型フォスファチジルコリン、ジオレイルフォスファチジルコリン、ジミリスチルフォスファチジルコリン、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、ジステアシルフォスファチジルコリン等が用いられる。各構成成分の使用割合

はフォスファチジルコリン1molに対しコレステロールは0.3~1mol、好ましくは0.4~0.6mol、M-PAG-PEは0.001~0.4mol、好ましくは0.02~0.1molの組成比が用いられる。さらに他のポリエチレングリコール部分を有する脂質誘導体を加える場合、フォスファチジルコリンの0.4mol比以下の組成比で用いられる。

【0023】次にこれらを、例えば溶媒を除去した脂質混合物を水和しホモジナイザー等で乳化後、凍結融解しマルチラメラリポソーム(MLV)を得る。さらに超音波処理、高速ホモジナイズ、あるいは均一ポアを持つメンブランで加圧ろ過する方法(Hope M. J et al, Biochimica et Biophysica Acta, 812, 55(1985))等でシングルラメラリポソーム(SUV)を作製し、適当な粒径に調整しても良い。このとき好ましい粒径としては20~300nm、より好ましくは30~200nmである。

【0024】かかるリポソームは、各種薬剤を封入することもできる。薬剤としてはアドリアマイシン、ダウノマイシン、マイトマイシン、シスプラチン、ビンクリスチン、エピルビシン、メトトレキセート、5FU(5-フルオロウラシル)、アクラシノマイシン等の抗癌剤、ゲンタマイシン等のアミノ配当体やスルペニシリン等のβ-ラクタム系抗生物質、リシンA、ジフテリアトキシン等の毒素、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ras遺伝子に対するアンチセンスRNA等が挙げられる。これらの薬剤をリポソーム内に封入するには、水溶性薬剤の場合は脂質を薬剤水溶液で水和することによって、また脂溶性薬剤の場合はいったん揮発性有機溶媒に薬剤と脂質を混合し、溶媒を留去後得られる薬剤、脂質混合物を水和することでリポソームに包埋することができる。

【0025】また、リポソームに機能性を付与する目的で、前述の通りリポソーム表面へ蛋白質、ペプチド、糖、親水性高分子等を結合(導入)することが好ましい。本発明に於いては、各種抗体、繊維芽細胞成長因子(FGF)、上皮細胞成長因子(EGF)等の成長因子または増殖因子等の蛋白質を結合(導入)することが好ましく、特に好ましいのは抗体である。抗体は、治療対象となる組織、細胞、細菌、ウイルス等と反応性を有する抗体(IgA, IgG, IgM等)であり、各種動物のポリクロナール抗体、マウスモノクロナール抗体、ヒトマウスのキメラ抗体、ヒト型のモノクロナール抗体等を用いることができる。

【0026】これらの蛋白質とリポソームとの結合には、リポソームのマレイミド基の二重結合と蛋白質のチオール基を利用できる。蛋白質へのチオール基の付与は具体的には、蛋白質のアミノ基に対し通常蛋白質のチオール化に用いるN-サクシンイミジル-3-(2-ピリ

ジルジチオ) プロピオネート (SPDP) (Carlsson J. et al, Biochem. J., 173, 723 (1978)) やイミノチオラン、メルカプトアルキルイミデート (Traut R. R. et al, Biochemistry, 12, 3266 (1973)) 等の化合物を用いて行う方法、蛋白質が抗体である場合は内在するシステイン残基のジチオール基を還元しチオール基とする方法が挙げられる。

【0027】抗体の中でもIgGを用いる場合はペプシン等の酵素処理によってF(ab')₂化し、さらにジチオスレイトール等で還元して得られるFab'に生じるチオール基をリボソームとの結合に供することができる (Martin F. J. et al, Biochemistry, 20, 4229 (1981))。IgMの場合は、Millerらの方法 (J. Biol. Chem., 257, 286 (1965)) に準じ、穏和な条件下でジチオスレイトールを用いて還元して得られるIgMsのFc部分のチオール基をリボソームとの結合に供するのがよい。

【0028】リボソームとかかる蛋白質との結合は、中性の緩衝液 (pH6.0-7.5) 中、2-16時間程度反応することにより達成される。本発明のリボソームを医薬組成物として利用するに当たっては、各種疾患に対し血管内投与法や膀胱内投与法、腹くう内投与法、局所投与法等の方法により投与することができる。またその投与量は、目的とする薬理作用、薬剤の種類等により適宜調整することができる。

【0029】

【実施例】以下、本発明につき実施例を挙げてより具体的に説明するが、その要旨を越えない限り以下に限定されるものではない。

実施例1 M-PEG-PEの合成

チオール化リン脂質の合成

クロロホルム/メタノール (6:5) 混液11mlに溶解したジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン 100mgに対し、イミノチオラン (シグマ社) 21.8mgを添加した。さらにトリエチルアミン50μlを加え、窒素ガス中、ニンヒドリン反応が陰性になるまで室温で攪反反応した。チオール化リン脂質の生成は、本反応液の一部にフルオレッセインマレイミド (フナコシ) を加え室温で40分間反応し、薄層クロマトグラフィー上新たな黄色蛍光スポットを呈することにより確認した。

【0030】ジマレイミドPEGの合成

M-PEG-PE

1mMEDTA含有0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.0)

0.5mM システイン

100μl

800μl

100μl

反応後、上記溶液960μlに5mM 4,4'-ジチオピリジン 40μlを加え、残存システインとの反応から呈色される324nmの吸光度変化を対照サンプルとのそれと比較することで算出した (呈色のモル吸光計

* 810mgのジアミノポリエチレングリコール (サンブライトVFM5001 (日本油脂): 平均分子量5000) をモレキュラーシーブで脱水したクロロホルム5mlに溶解し、100mgのN-(ε-マレイミドカプロイルオキシ) スクシンイミドおよび50μlのトリエチルアミンを添加し、窒素ガス中、室温で攪反反応した。ニンヒドリン反応が陰性になったことを確認し、ジマレイミドPEGとした。

【0031】結合および精製

10 クロロホルムで30mlに希釈した上記ジマレイミドPEG溶液4mlに対し、上記チオール化リン脂質溶液10mlを徐々に添加後、窒素ガス条件下、室温で3時間攪反した。得られた本反応液20mlに十分量のヘキサンを加え、M-PEG-PEを含有する沈澱を析出させた。真空乾燥後330mgであった。これに蒸留水10mlを加え溶解し、16000×g 5分間の遠心分離で不溶物を除去した。さらに等量の蒸留水を加え、分子量分画100kの限外濾過膜を装着したセントリコン100 (アミコン) で濃縮濾過を繰り返した。本精製過程で、脂質誘導体化されていないPEGは膜分離された。

【0032】NMRによる測定

図1に示す目的物の¹H-NMRのチャートが示す様に、リン脂質のアルキル鎖プロトン1.54ppmのシグナル、PEGの-CH₂CH₂O-に由来する3.57ppmのシグナルおよびマレイミドの2重結合に由来する6.61ppmのシグナルが確認された。

参考例1

30 実施例1で示した様に、本発明のリン脂質誘導体は水溶液中で分子集合体として挙動していると考えられた。そこで水溶液中のM-PEG-PEの形態を検討した。

【0033】蒸留水に0.5mg/mlの濃度に溶解したM-PEG-PEを動的光散乱法 (ELS-800 大塚電子) で測定したところ、24.8nmの粒子 (GAMMA) 分布が認められた。

実施例2 マレイミドの測定

実施例1で得られたM-PEG-PEのマレイミド含量は、本溶液にシステインを添加し、マレイミドにより消費されるSH量を4,4'-ジチオピリジンを用い定量した。すなわち、M-PEG-PEの1.1mg/mlの水溶液を以下の割合で混合し室温で30分反応させた。

【0034】

【表1】

数は19800/Mを用いた)。

【0035】その結果、M-PEG-PE 1mg当たり0.17μmolのマレイミド量が検出された。

実施例3 M-PEG-PEを含有するリボソームの

作製

ジパルミトイルフォスファチジルコリン 50mg, コレステロール 14.6mg, M-PEG-PE 10.7mg および脂溶性マーカーとして FITC-DPPE (1, 2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phospho [N-(5-fluoresceinthiocarbamoyl)] ethanolamine, シグマ) 0.16mg をクロロホルムで均一に溶解し、エバポレーターで溶媒を除去、脂質フィルムを形成した。さらに真空ポンプで2.5時間減圧乾燥後、0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.0)、1mM EDTA 1ml を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し水和した。さらに液体窒素と65℃の温浴で5回凍結融解を繰り返し、乳白色のマルチラメリポソーム (MLV) を得た。

【0036】上記 MLV 0.5ml を同上緩衝液で1ml とし、プローブ型ソニケーター (ブランソン社 ソニファイヤー450) を用い出力20%で10分間超音波処理することで透明な小粒径リポソーム (SUUV) 溶液が得られた。得られたリポソームの動的光散乱法により測定した粒径分布を図2に示す。1μm以上の粒子は全く混入していないことがわかる。

比較例

脂質組成にM-PEG-PEを含まないこと以外は実施例3と同様にMLVを作製した。同様に10分間の超音波処理を2回繰り返した後、動的光散乱法により粒径分布を測定した結果を図3に示す。1μm以上の粒子が混入しており十分な小粒径化が達成されていなかった。

実施例4 M-PEG-PE含有リポソームへの抗体結合

抗腫瘍性ヒトモノクローナル抗体 (IgG: 特願平4-162849号に記載のGAH) を0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) で1/40mol量のペプシン (Cooper Biomedical) を加え、37℃で一晩反応し、F(ab')₂ に切断した。

【0037】さらに陽イオン交換樹脂 (Mono S, ファルマシア) によるクロマト分離でF(ab')₂ を単離した。分離は0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中、0から1.0M NaClの直線的濃度勾配法により行い、F(ab')₂ を得た。緩衝液をPD-10カラム (ファルマシア) で50mM リン酸緩衝液 (pH 7.5)、1mM EDTAに交換し、抗体濃度 2.4mg/mlの溶液を得た。そこにイミノチオラン (3mg/ml) を抗体の4倍モル量添加し、37℃で1時間反応した。未反応のイミノチオランを0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.0)、1mM EDTAで平衡化したPD-10カラムで脱塩除去し1.9mg/mlのチ

オール化抗体を得た。

【0038】本抗体0.7mlに実施例3で得られたSUUVリポソーム0.42ml加え、室温で一晩震とうしてイムノリポソームを作製した。

実施例5 ターゲット細胞への反応性

スライドチャンパー (ラボテックチャンパー、ヌンク社) 上で培養し、パラホルムアルデヒドで固定したヒト胃ガン細胞株MKN45 (実施例4で用いた抗体と反応性を有する) を用い、実施例4で作製したイムノリポソームの反応性を確認した。リポソーム溶液50μl、ヒト血清 150μlおよび10mMリン酸緩衝液 (pH 7.4)、0.15M NaCl 50μlからなる反応液を細胞に添加し、37℃で30分インキュベートした。同緩衝液で洗浄後マーカーとして導入したFITC-DPPE (前述) の蛍光を蛍光顕微鏡 (共焦点光学システム VX100、ニューポート) で観察した。それぞれの蛍光顕微鏡写真を図4 (抗体結合リポソーム)、図5 (比較例で作製したリポソーム)、図6 (図5の明視野像) に示す。対照として用いたリポソームと比較し、MKN45細胞に対する本イムノリポソームの高い反応性が示された。

【0039】

【発明の効果】本発明のリン脂質誘導体は、リポソームを構成するリン脂質成分として有用であり、これを用いたリポソームは、ポリアルキレングリコール部を有することから肝臓、脾臓等の網内系での非特異的取り込みを抑制することができる。また本発明のリン脂質誘導体を用いることにより、容易にリポソームを小粒径化することができる。

30 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得られたM-PEG-PEの¹H-NMRのチャートを示す図である。

【図2】実施例3で作製したM-PEG-PE含有リポソームの粒径分布を動的光散乱法により測定した結果を示す図である。

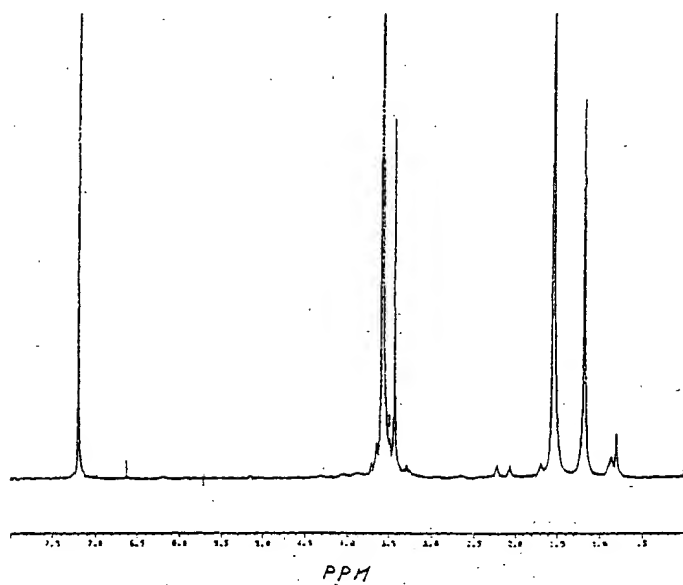
【図3】比較例で作製したM-PEG-PE非含有リポソームの粒径分布を動的光散乱法により測定した結果を示す図である。

【図4】実施例4で作製した抗体結合リポソームのヒト胃ガン細胞MKN45に対する反応性を示した図である。リポソームに組み込んだ蛍光脂質をマーカーとして蛍光顕微鏡で観測した。

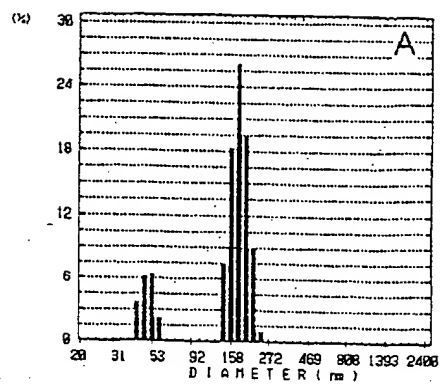
【図5】比較例で作製したリポソームのヒト胃ガン細胞MKN45に対する反応性を示した図である。リポソームに組み込んだ蛍光脂質をマーカーとして蛍光顕微鏡で観測した。

【図6】図5の明視野像を示す図である。

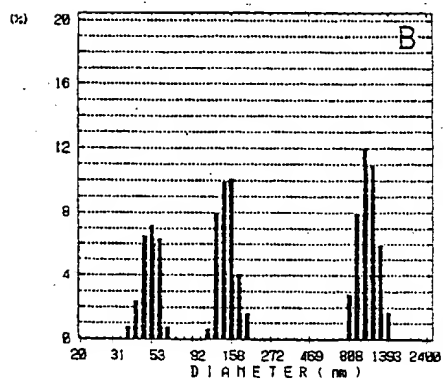
【図1】



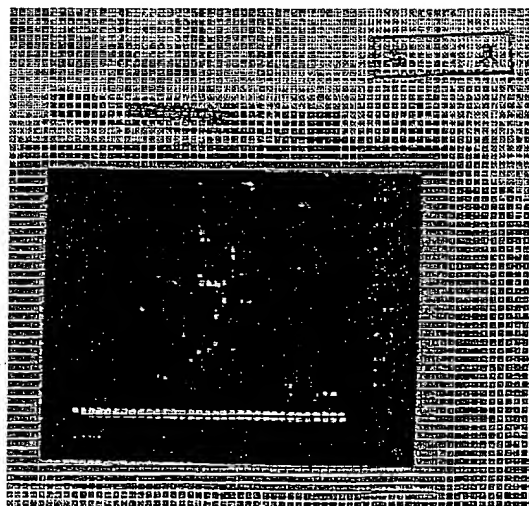
【図2】



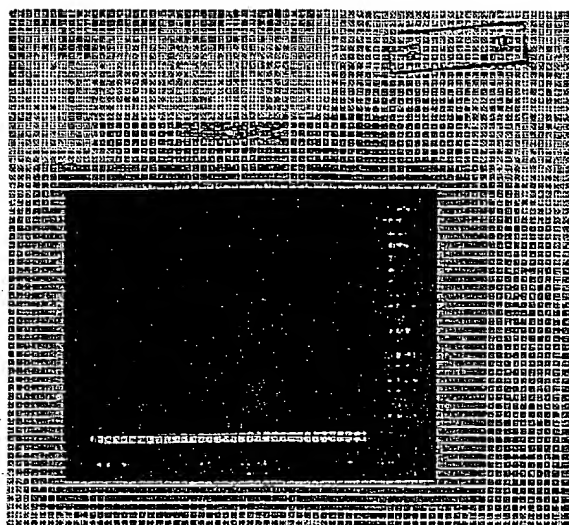
【図3】



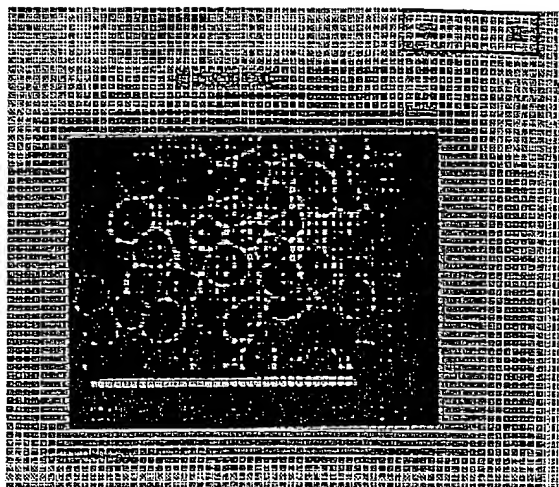
【図4】



【図5】



【図6】



【手続補正書】

【提出日】平成5年7月20日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図4

【補正方法】変更

【補正内容】

【図4】実施例4で作製した抗体結合リポソームを含む反応液中でインキュベートしたヒト胃ガン細胞MKN45の形態を表す、図面に代わる蛍光顕微鏡写真である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図5

【補正方法】変更

* 【補正内容】

【図5】比較例で作製したリポソームを含む反応液中でインキュベートしたヒト胃ガン細胞MKN45の形態を表す、図面に代わる蛍光顕微鏡写真である。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図6

【補正方法】変更

【補正内容】

【図6】比較例で作製したリポソームを含む反応液中でインキュベートしたヒト胃ガン細胞MKN45の形態を表す、図面に代わる蛍光顕微鏡写真（明視野像）である。

*

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

C07F 9/572

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

Z 9155-4H

【公報種別】 特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】 第3部門第2区分

【発行日】 平成13年2月6日 (2001. 2. 6)

【公開番号】 特開平6-220070

【公開日】 平成6年8月9日 (1994. 8. 9)

【年通号数】 公開特許公報6-2201

【出願番号】 特願平5-27651

【国際特許分類第7版】

C07F 9/10

A61K 9/127

47/48

B01J 13/02

C07F 9/572

【F I】

B01J 13/02 Z

C07F 9/10 B

A61K 9/127 F

47/48 Z

C07F 9/572 Z

【手続補正書】

【提出日】 平成11年9月8日 (1999. 9. 8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 特許請求の範囲

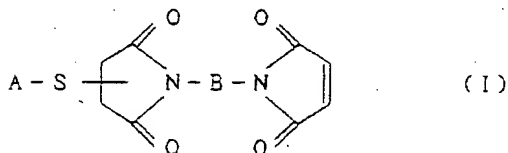
【補正方法】 追加

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式 (I) で表されるリン脂質誘導体。

【化1】



(上記式中、Aはフォスファチジルエタノールアミン部分を有するリン脂質の残基を表し、Bはポリアルキレングリコール部分を有する連結基を表す。)

【請求項2】 請求項1記載のリン脂質誘導体を含有することを特徴とするリポソーム。

【請求項3】 リン脂質誘導体を介して蛋白質が結合されていることを特徴とする請求項2記載のリポソーム。

【請求項4】 蛋白質が抗体であることを特徴とする請求項3記載のリポソーム。

【請求項5】 請求項2から4のいずれかに記載のリポソームを含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項6】 請求項2から4のいずれかに記載のリポソームを含有することを特徴とする抗癌剤。